

# بررسی اثر فاکتور رشد در استحکام تاندون همراه با تابش پلاسما در خرگوش

علیرضا عمرانی فرد<sup>۱</sup>، علیرضا جهان‌دیده\*<sup>۱</sup>، احمد اصغری<sup>۱</sup>، سعید حصارکی<sup>۲</sup>

## چکیده

زمان بر است. عوامل ایجاد کننده آسیب های تاندونی بسیار گسترده هستند، و عوامل متفاوتی بر شدت و ماهیت این آسیب ها اثر گذارند مانند شدت فعالیت بدنی، سن، ژنتیک، عوامل محیطی، جنسیت و بیماری های زمینه ای. همچنین استرس های مستمر طولانی روی تاندون و با تحمیل نیروی بیشتر از حد تحمل بیومکانیک تاندون تا داروهای کورتیکواستروئیدی میتوانند منجر به آسیب تاندونی شوند. پارگی می‌تواند در اثر تروما و یا وزن گیری ناگهانی در تاندون‌های سالم نیز رخ دهد (۳۰٪). تاندونیت یا تاندونوز می‌تواند در تاندون‌هایی که در معرض فعالیت مستمر بدون مهلت ترمیم خود بخودی و بیش از حد قرار دارند و یا دژنراسیون بافتی مرتبط با سن رخ دهد. سرعت ترمیم در تاندون بسته به ناحیه آسیب دیده آن متفاوت است. اگرچه ترمیم در تاندون ها با سرعت متفاوتی رخ می‌دهد، اما به طور کلی از روند معمول بهبود زخم، مانند فاز التهابی اولیه، و به دنبال آن مراحل ترمیم و بازسازی پیروی می‌کند (۱۳). اهداف اصل درمان مدیریت درد و بازیابی عملکرد اندام میباشد روش های درمانی متعددی برای بهبود روند و تسریع ترمیم و بازیابی عملکرد اندام با تاندون آسیب دیده ارائه شده که از جمله می توان به پروسه های درمان های مبتنی بر فاکتور های رشد سلولی مختلف ، لیزر تراپی، استفاده از امواج شاک ویو، سلول های بنیادی و استفاده از پلاسما اشاره کرد . شروع زودهنگام تمرینات توانبخشی که بر وزن گیری کنترل شده بر روی اندام آسیب دیده تاکید

امروزه درمان تاندون آسیب دیده و بازیابی عملکرد آن در انسان و حیوانات از چالش های پزشکی است . هدف: بررسی درمان همزمان فاکتور دو رشد فیبروبلاست (bFGF) و پلاسما سرد اتمسفریک (CAP) بر استحکام کششی تاندون با نقیصه تجربی آشیل خرگوش انجام شد. روش کار : در ۲۰ خرگوش تحت جراحی نقیصه تجربی تاندونی مشابه ایجاد شد بعد از بخیه پوست به چهار گروه تقسیم شدند ، در گروه اول یا کنترل آزمایش؛ ۰.۲ (mL) آب مقطر در بالا و پایین محل آسیب تزریق شد. در گروه دوم یا درمان مستقل با bFGF؛ محلول حاوی ۱۰ (µg) از bFGF در بالا و پایین ضایعه تزریق شد. در گروه سوم درمان مستقل CAP؛ تاندون آشیل طی ۲۱ روز، روزانه به مدت ۳۰ ثانیه در معرض CAP از روی سطح پوست قرار گرفت. گروه چهارم یا درمان ترکیبی (bFGF+CAP)؛ بطور همزمان تحت درمان با CAP و bFGF قرار گرفتند. یافته ها : نتایج نشان داد گروه CAP+bFGF نسبت به گروه کنترل و گروه های درمان مستقل از لحاظ بافت شناسی پیشرفت ترمیمی قابل توجهی دارد ( $P < 0/05$ ). آزمون کشش با تحمل نیروی (N125/04) نیوتن مقاومت بالاتری نسبت به سایر گروه های آزمایش نشان داد ( $P < 0/001$ ). نتیجه گیری: به نظر میرسد CAP و bFGF به تنهایی تاثیر مشابه و مثبتی بر روند ترمیم و استحکام تاندون دارند ولی استفاده همزمان آنها منجر به تقویت اثر آنها بر فرایند التیام و ساختار تاندون ترمیم شده و در نهایت باعث افزایش قابل توجه استقامت تاندون در برابر کشش میشود.

واژگان کلیدی: ترمیم تاندون، پلاسما سرد اتمسفری، فاکتور دو رشد فیبروبلاست، بافت شناسی، کشش تاندون

تاریخ دریافت: ۱۴۰۳/۶/۱۸ تاریخ پذیرش: ۱۴۰۳/۸/۲۳

## مقدمه

آسیب های تاندون جز اختلالات شایع سیستم اسکلتی عضلانی است و منجر به احساس درد و فقدان عملکرد طبیعی اندام شده که مدیریت درمانی این آسیب ها بسیار

۱- گروه علوم درمانگاهی، دانشکده دامپزشکی، واحد علوم و تحقیقات، دانشگاه آزاد اسلامی، تهران، ایران  
dr.jahandideh@gmail.com

۲- گروه پاتوبیولوژی، دانشکده دامپزشکی، واحد علوم و تحقیقات، دانشگاه آزاد اسلامی، تهران، ایران

فسفاتیدیل‌اینوزیتول ۳-کیناز (Phosphatidylinositol 3-phosphate) و پروتئین کیناز فعال شده (Ras-Raf-mitogen) (MAPK) منتقل می‌کند. (۵) در مطالعه‌ای تزریق فاکتور دو رشد فیبروبلاست (bFGF) در بالا و پایین محل ترمیم تاندون خرگوش نشان داد آرایش قرارگیری و سازمان دهی فیبرهای کلاژن در محل ترمیم به صورت قابل توجهی نسبت به گروه کنترل بهتر صورت گرفته است (۲۲). محققان کشف کردند که تابش پلاسمای سرد اتمسفری باعث ازدیاد تمایز سلولی و پرولیفریشن فیبروبلاست و متعاقب آن تولید پیش‌سازهای کلاژن می‌شود (۱۲). استفاده از پلاسمای سرد اتمسفری بر روی موش‌ها منجر به افزایش سوپر اکسید دیسموتاز (SOD)،  $TGF-\beta$ ، کاتالاز (CAT) و گلوکاتایون پراکسیداز شد. که باعث بهبود زخم در موش‌های صحرایی دیابتی شده است (۹). پلاسمای سرد از طریق تابش سطحی باعث افزایش اکسیژن فعال (ROS) بین سلولی در بافت‌های زیرین سطح پوست و موجب افزایش سیگنال‌ها بین سلول‌های استئوژنیک و کندروژنیک به صورت همزمان می‌شود که این افزایش سیگنالینگ باعث ارتقاء تمایز و همچنین سنتز پروتئین‌ها در سلول‌ها می‌شود (۲۹). در مطالعه‌ای با بررسی اثر پلاسمای سرد اتمسفریک بر روی سلول‌های فیبروبلاست پوست نشان دادند که یک درمانی کوتاه مدت دو دقیقه‌ای با پلاسمای سرد باعث افزایش تولید سایتوکین‌ها و افزایش سنتز فاکتورهای رشد شده و همچنین این درمان اثری بر فرایند آپوپتوزیس سلول‌ها از خود نشان نداد از سوی دیگر پلاسمای باعث القای مهاجرت فیبروبلاست شده و باعث افزایش سنتز کلاژن تایپ یک و همچنین (Alpha-smooth muscle actin) می‌گیرند که در فرایند ترمیم اثر بسیار مهمی دارند (۴). هدف این مطالعه نشان دادن تاثیر بالقوه استفاده از پلاسمای سرد اتمسفری به

دارند نیز مفید گزارش شده است (۲۱). تاثیر کرایوتراپی، داروهای ضد التهابی غیراستروئیدی و کورتیکواستروئیدها در کنترل درد در برخی تحقیقات نشان داده شد و استفاده کوتاه مدت از این داروها علاوه بر کاهش درد باعث افزایش دامنه حرکتی می‌شود که می‌تواند به بیماران در تکمیل تمرینات توانبخشی کمک کند. هر چند تزریق کورتیکواستروئیدها در داخل و نزدیک تاندون‌هایی که وزن زیادی بر آنها وارد می‌شود خطر پارگی را بسیار افزایش می‌دهد. استفاده از نیتروگلیسرین موضعی همراه با شاک ویو، تزریق پلاسمای غنی از پلاکت به همراه لیزر شواهد اثرات درمانی در برخی از تاندونوپاتی‌ها دارند و از درمان‌های همزمان ارائه شده با اثرات مثبت درمانی غیر جراحی هستند (۳۱) از متد‌های تحقیقاتی جدید و پیشرفته‌ای که برای درمان تاندون‌های آسیب دیده ارائه شده می‌توان از مهندسی بافت با استفاده از داربست‌های سلول‌های بنیادی، ژن درمانی، استفاده از محرک‌های رشد و تکثیر سلولی و سنتز ماده زمینه خارج سلولی نام برد (۲۴). فاکتورهای رشد فیبروبلاست (FGFs) عوامل پروتئینی سیگنالینگ سلولی هستند که به میزان زیادی در بافت‌های در حال رشد و بالغ تولید می‌شوند. که به صورت موضعی عمل کرده و با اتصال به سلول‌های مانند استئوبلاست، فیبروبلاست و تنوسیت‌ها به واسطه گیرنده‌های خود روی غشای سلولی در فرآیند‌های بیولوژیکی، مانند میتوز، تمایز سلولی، کنترل متابولیک، مهاجرت سلولی، رگ‌زایی، و ترمیم آسیب بافتی، تعامل داشته باشند (۲۶). استفاده از فاکتور رشد فیبروبلاست بازیک (bFGF) یا (FGF2) در محل ضایعه تاندون، روند بهبودی را با افزایش سنتز فیبرهای کلاژن تسریع کرده و متعاقب آن مقاومت بیومکانیکی تاندون را افزایش می‌دهد (۲۰). bFGF سیگنال سلولی را از طریق اتصال به گیرنده‌های تیروزین کیناز فاکتور رشد فیبروبلاست (FGFRs) و مولکول‌های سیگنال دهنده مانند

بین دو الکتروود شده و پلاسما تولید میشود. در این مطالعه ولتاژ دستگاه روی ۱۰ کیلو ولت و فرکانس به ۱۰ کیلوهرتز تنظیم شد و در دمای اتاق با استفاده از هوا تولید پلاسما میکند (۲).

### عملیات جراحی و پروتکل درمان گروه های مورد آزمایش

جهت آرام کردن حیوان از اسپرومازین ۲٪ به میزان ۱ میلی گرم بر کیلوگرم استفاده شده و برای ایجاد بیهوشی از کتامین به میزان ۳۰ میلی گرم بر کیلوگرم و زایلازین به مقدار ۵ میلی گرم بر کیلوگرم استفاده شد. برای تسهیل بیهوشی از دیازپام به میزان ۱ میلی گرم بر کیلوگرم استفاده شد. پس از ایجاد بیهوشی و حالت گماری خرگوش به روی جناغ، موضع عمل در ناحیه تاندون آشیل پوست ناحیه تراشیده و با بتادین اسکراب و محلول بتادین و الکل ضد عفونی گردیده. سپس موضع عمل شان گذاری شد. یک نقیصه تاندونی طولی تمام قطر به طول ۱ سانتی متر در تاندون آشیل با استفاده از تیغ بیستوری شماره ۱۱ طی ۱۰ بار برش ایجاد شده و بعد از پایان جراحی برای بافت زیر جلدی از نخ ویکریل (۴.۰) و در نهایت برای بستن زخم جراحی در پوست از نخ نایلونی (۳.۰) استفاده می شود. سپس کلیه حیوانات به قفس خود منتقل شدند. در گروه اول یا همان گروه کنترل (Control) هیچ گونه درمانی صورت نمیگیرد و فقط ۰/۱ میلی لیتر آب مقطر در روز جراحی در بالا و پایین محل جراحی در غلاف تاندون آشیل به عنوان پلاسیبو تزریق گردید. گروه دوم یا گروه فاکتور دو رشد فیبروبلاست یا (bFGF) ۱۰ (µg) فاکتور دو رشد فیبروبلاست در ۰/۲ میلی لیتر آب مقطر محلول شده و به میزان ۰/۱ میلی لیتر در بالا و پایین محل جراحی در غلاف تاندون آشیل تزریق گردیده و در گروه سوم یا گروه پلاسما CAP بلافاصله بعد از ایجاد جراحی و بخیه پوست

همراه فاکتور رشد فیبرو بلاست بر استقامت تاندون دارای نقیصه خرگوش در برابر کشش است.

### مواد و روش کار

#### حیوانات مورد مطالعه

در این مطالعه از تعداد ۲۰ سر خرگوش نر سفید نیوزیلندی بالغ با وزن ۳ کیلوگرم استفاده شد. حیوانات از بخش تکثیر و نگهداری حیوانات آزمایشگاهی انستیتو پاستور ایران تهیه شدند. حیوانات بر مبنای درمان به ۴ گروه تقسیم شدند همه حیوانات تحت شرایط محیطی و تغذیه ای یکسان (دما، رطوبت، نور، نوع جیره غذایی و تعداد دفعات تغذیه) نگهداری شدند. آنها در اتاقی با دمای ثابت  $22 \pm 1$  درجه سانتیگراد، رطوبت نسبی  $40 \pm 1$  درصد و چرخه نور/تاریکی ۱۲ ساعت نگهداری شدند. در این تحقیق کلیه آزمایشات با رعایت اصول راهنمای مراقبت و استفاده از حیوانات تحقیقاتی مصوب دانشگاه آزاد اسلامی واحد علوم و تحقیقات انجام شد.

### فاکتور دو رشد فیبروبلاست و دستگاه پلاسما سرد اتمسفری

فاکتور رشد استفاده شده در این مطالعه از نوع (rhbFGF Fibroblast Growth Factor-Basic Heparin Stabilized human) و ساخته شده توسط شرکت سیگماآلدریچ (Sigma Aldrich) بود. دستگاه پلاسما مورد استفاده در این مطالعه از نوع پلاسما جت اتمسفری با گاز حامل هوا بود. که در مرکز تحقیقات فیزیک پلاسما دانشگاه آزاد واحد علوم تحقیقات ساخته شده. این سیستم تولید گاز پلاسما شامل یک منبع تغذیه ولتاژ بالا و یک نازل پلاسما است نازل پلاسما دارای دو الکتروود است که یکی از الکتروودها در مرکز و الکتروود دیگر در حاشیه لوله نازل قرار دارد و توسط منبع تغذیه ولتاژ بالا پالس DC تغذیه می شود میدان مغناطیسی ایجاد شده باعث یونیزاسیون شدید گاز موجود

### هیستوپاتولوژی و روش های رنگ آمیزی

ارزیابی هیستوپاتولوژی بر اساس یک سیستم امتیاز دهی به بافت ترمیم شده برای تعیین اثر بخشی درمان های صورت انجام شد. فاکتور های مورد مطالعه عبارتند از التهاب، توسعه عروق، تراکم سلول ها و میزان گرد بودن هسته سلول ها، توسعه رشته های رتیکولر، ضخامت دسته های کلاژنی و آرایش رشته های کلاژن بوده و به صورت امتیاز ۰ برای یا عدم وجود (۰٪) امتیاز ۱ برای مقادیر خفیف (کمتر از ۲۵٪) امتیاز ۲ برای مقادیر متوسط، ۲ (۲۵-۵۰٪)، و امتیاز ۳ برای مقادیر شدید یا (۵۰-۷۵٪) رتبه بندی می شوند. (۲۵)

جهت بررسی میکروسکوپی از نمونه های تاندون لام تهیه گردید و از رنگ آمیزی ماسون تری کروم (Trichrome masson) و رنگ آمیزی رتیکولین (Reticuline) به ترتیب برای ارزیابی تولید کلاژن نوع (I) و (III) استفاده گردید. بدین منظور برای رنگ آمیزی مقاطع تاندونی بر روی لام ها جایگذاری شد. جهت رنگ آمیزی رتیکولین ابتدا لام های آماده شده را در محلول پتاسیم پرمنگنات (Potassium permanganate) به مدت ۵ دقیقه قرار داده سپس به مدت ۲ دقیقه با آب مقطر شسته شد. برای بی رنگ سازی لام در محلول اگزالیک اسید (Oxalic acid) قرار گرفته و بعد از شستشو با آب مقطر به مدت ۱۰ دقیقه در محلول سولفات آلومینیوم فریک (Aluminum sulphate- Ferric) انکوبه میشود بعد از شستشو با آب مقطر روی هر لام چند قطره محلول نیترات نقره (Silver nitrate) ریخته و دو بار سریع لام ها را با آب مقطر شستشو می دهیم سپس لام ها در محلول فرمالین ۱۰٪ به مدت ۲ دقیقه انکوبه کرده و با آب مقطر شستشو داده شد سپس یک دقیقه در کلرید طلا ۰.۲٪ (Gold chloride) داده بعد با آب مقطر شستشو داده شد و بعد به مدت یک دقیقه به محلول تیوسولفات سدیم ۵٪ (Sodium

تاندون آشیل تحت تابش پلاسمای اتمسفریک سرد هر روز به مدت ۳۰ ثانیه برای ۲۱ روز متوالی با ولتاژ ۱۰ کیلو ولت و فرکانس ۱۰ (KHz) قرار گرفت، و در گروه چهارم یا گروه فاکتور دو رشد فیبروبلاست دو به همراه پلاسمای (bFGF+CAP) ۱۰ میکروگرم فاکتور دو رشد فیبروبلاست در ۰.۲ میلی لیتر آب مقطر رقت سازی شده و به میزان ۰.۱ میلی لیتر در بالا و پایین محل جراحی در غلاف تاندون آشیل تزریق گردیده و تحت تابش پلاسمای اتمسفریک سرد هر روز به مدت ۳۰ ثانیه با رعایت فاصله ۱۰ سانتیمتری از سطح پوست برای ۲۱ روز متوالی با ولتاژ ۱۰ کیلو ولت و فرکانس ۱۰ کیلو هرتر قرار گرفتند. (۱، ۲۲).

### ارزیابی قدرت تحمل نیروی کشش

بعد از گذشت ۱۲۰ روز از جراحی حیوانات به صورت انسانی معدوم و تاندون ها از محل قبل از اتصال به استخوان و عضله قطع شدند نمونه های تاندون ها از لحاظ قطر و طول مشابه بودند. جهت ارزیابی استقامت در برابر کشش در تاندون از حد شکست یا مقدار نیرویی که در آن نمونه پاره میشود و یا اصطلاحاً میشکند استفاده شد. در این مطالعه از دستگاه کشش پلیمر (Zwick/Roell) در آزمایشگاه کشش پژوهشگاه پلیمر استفاده گردید و حداکثر میزان نیروی قابل تحمل تاندون ها را ثبت کرد. نمونه تاندون ها با طول یک سانتیمتر و سطح مقطع میانگین پنج میلیمتر مربع بعد از جدا سازی در بافر (Hank's) قرار داده شده و بعد از انتقال به پژوهشگاه مورد نظر از سمت بالا و پایین به گیره های دستگاه متصل شده و سپس تا زمان پارگی تحت کشش قرار گرفت و نیرو بر حسب نیوتن وبا سرعت ۰/۱ میلیمتر در ثانیه به تاندون وارد می شود و افزایش ناگهانی فاصله های بین گیره ها به منزله از دست دادن یک پارچگی ساختاری بافت توسط دستگاه تشخیص داده شده و میزان نیروی مورد استفاده در لحظه گسست به عنوان حد شکست در نظر گرفته شد.

## نتایج

۱۲۰ روز بعد از جراحی خرگوش ها از لحاظ بصری در محل جراحی فاقد عفونت و نکروز بودند همچنین سطح پوست دارای خط اسکار ناشی از جراحی و پوشیده از مو بود. بعد از معدوم سازی انسانی نمونه های تاندون اخذ شده و جهت آزمون کشش و تهیه لام و رنگ آمیزی مورد استفاده قرار گرفتند.

## هیستوپاتولوژی

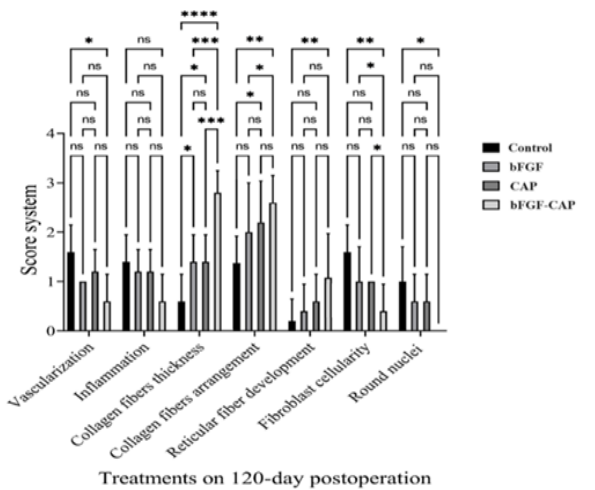
نتایج بدست آمده نشان داد فعالیت التهابی اطراف و محل نقیصه در تمام گروه ها در حداقل و اختلاف معنی داری بین گروه ها مشاهده نشد. توسعه عروق جدید در گروه bFGF+CAP و همچنین گروه CAP و گروه bFGF مشابه بود اما اختلاف معنی داری را با گروه کنترل دیده شد ( $P<0.05$ ). در تولید رتیکیلین در بین گروه های درمان اختلاف معنی داری دیده نشد اما گروه bFGF+CAP اختلاف معنی داری را با گروه کنترل نشان داد ( $P\leq 0.002$ ). کمترین تعداد سلول های تنوسیت در گروه bFGF+CAP با هسته های دوکی شکل مشاهده شد که از لحاظ آماری اختلاف معنی داری را با گروه کنترل ( $P\leq 0.002$ ) و گروه CAP ( $P<0.05$ ) و گروه bFGF ( $P<0.05$ ) نشان داد. گروه CAP و گروه bFGF عملکرد مشابهی از لحاظ توسعه عروقی و شکل هسته و تراکم سلولی از خود نشان دادند و از لحاظ آماری تفاوت معنی داری را با گروه کنترل نشان دادند ( $P<0.05$ ). دسته جات ضخیم تر کلاژن در گروه bFGF+CAP دیده شد این اختلاف از لحاظ آماری با گروه کنترل بسیار معنی دار بود ( $P\leq 0.0001$ ) و نسبت به گروه های گروه CAP و گروه bFGF اختلاف معنی داری ( $P\leq 0.002$ ) را نشان داد و گروه CAP و bFGF عملکرد مشابهی داشتند اما اختلاف معنی داری را با گروه کنترل نشان دادند ( $P<0.05$ ). همچنین در گروه bFGF+CAP رشته

thiosulfate منتقل شده بعد از شستشو با آب مقطر جهت رنگ دار شدن هسته سلول ها لام ها با محلول رنگ (Red Fast Nuclear) به مدت پنج دقیقه انکوبه شده و بعد از شستشو با آب در دمای اتاق خشک شده و با لامل روکش شده و با میکروسکوپ (Optica-B-500Bi) مورد بررسی قرار گرفت.

برای رنگ آمیزی ماسون تری کروم لام ها بعد از پارافین زدایی و هیدراسیون لام ها به مدت ۱۰ دقیقه در محلول آبیرون هماتوکسیلین (Iron Haematoxylin) قرار گرفته و بعد از شستشو به مدت ۲ دقیقه در محلول بیبریچ اسکارلت (Biebrich scarlet) و اسید فوشین قرار گرفته و سپس با آب مقطر شسته شد سپس به مدت ۱۰ دقیقه در محلول اسید فسفومولیبدیک - فسفوتنگستیک (Phosphomolybdic-Phosphotungstic acid) قرار داده شد و بعد بدون آبکشی برای ۱۰ دقیقه به محلول آنیلین بلو (Aniline Blue) منتقل شد سپس با آب مقطر آبکشی شد. سپس ۴ دقیقه در محلول اسید استیک ۱٪ قرار گرفت سپس شسته شده و با استفاده از اتیل الکل ۹۵٪ آبگیری شده و در انتها برای شفاف سازی لام ها از زایلین (Xylene) استفاده شد و با میکروسکوپ (Optica-B-500Bi) مورد بررسی قرار گرفت.

## تحلیل آماری نتایج

نتایج کیفی حاصل از ارزیابی بافت شناسی لام ها با استفاده از سیستم ارزیابی هیستوپاتولوژی تاندون بر اساس امتیاز دهی (۲۵) انجام شد تا نتایج کیفی به نتایج کمی تبدیل شوند و توسط آزمون کروسکال والیس با استفاده از نرم افزار SPSS ۲۷ مورد تحلیل آماری گرفت. نتایج به دست آمده آزمون کشش با استفاده از آنالیز واریانس یک طرفه و جهت مقایسه بین گروهی از آزمون توکی استفاده گردید. و برای رسم نمودار ها نیز از نرم افزار 9 prism استفاده گردید. سطح معنی داری ( $p<0.05$ ) در نظر گرفته شد.

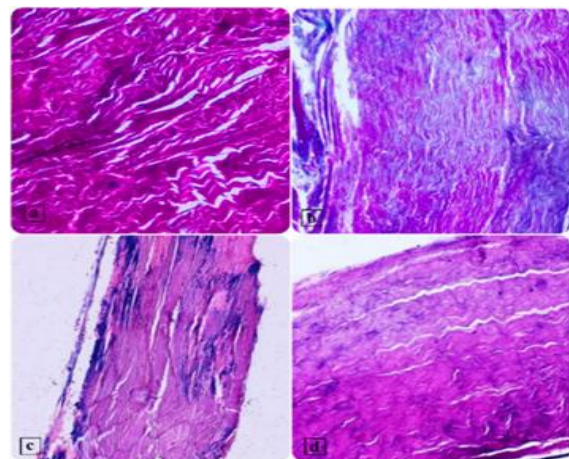


نمودار ۱ نمودار امتیازات بافت شناسی گروه ها که نشان دهنده عملکرد بهتر گروه در فرایند ترمیم است.  $P \leq 0.03$ ,  $P \leq 0.002$ ,  $P \leq 0.0001$ ,  $P \leq 0.0002$ ,  $P \leq 0.0001$ , ns= Not significant

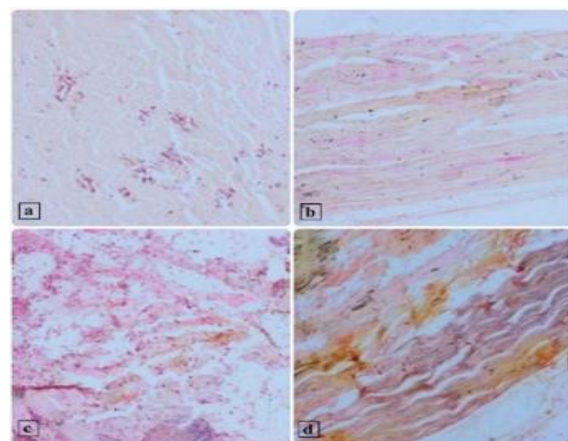
### آزمون کشش

نتایج نشان داد گروه bFGF+CAP با میانگین تحمل نیروی ۱۲۵/۰۴ نیوتن و (SD 2.7763) بالاترین قدرت تحمل نیروی کشش را نسبت به سایر گروه ها دارد ( $P \leq 0.002$ ) گروه های پلاسما CAP با میانگین تحمل نیروی ۱۰۴/۴۴ نیوتن و (SD 2.288) و فاکتور رشد bFGF با میانگین تحمل نیروی ۱۰۶/۶ نیوتن و (SD 3.048) از لحاظ آماری اختلاف معنی داری با یکدیگر را نشان ندادند (ns) هرچند با گروه فاکتور رشد به همراه پلاسما bFGF+CAP ( $P \leq 0.03$ ) و گروه کنترل (Control) ( $P \leq 0.03$ ) تفاوت معنی داری را نشان دادند. این آزمون کمترین میزان استقامت در برابر آزمون کشش را با میانگین تحمل نیروی ۹۱/۷۴ نیوتن و (SD 2.6791) نشان داد. (نمودار ۲)

های کلاژن از لحاظ آرایش قرارگیری در یک راستا و منظم و نسبت به گروه کنترل آرایش بسیار بهتری را نشان داد هرچند گروه CAP و گروه bFGF سازماندهی کلاژنی مشابه را نشان دادند و تاثیر بهتری نسبت به گروه کنترل ( $P < 0.05$ ) داشتند ولی سازمان دهی ضعیف تری نسبت به گروه bFGF+CAP را نشان دادند. ( $P < 0.05$ ). (نگاره ۱و ۲)، (نمودار ۱)

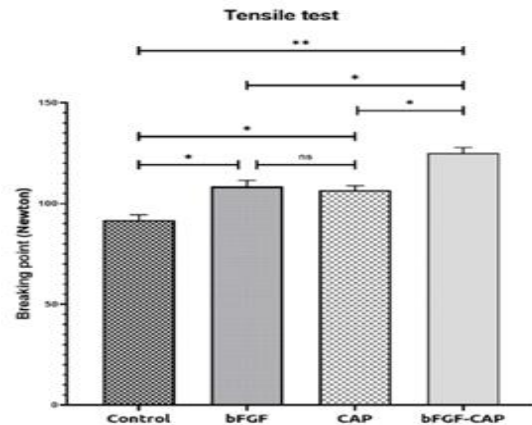


نگاره ۱ رنگ آمیزی تریکروم ماسون a, b, c و d به ترتیب گروه های کنترل، bFGF، CAP و bFGF+CAP را نشان دادند (x100) سلول های کمتر، عروق کمتر و تراکم و هم راستایی بهتر دسته های کلاژن در گروه bFGF+CAP است.



نگاره ۲ رنگ آمیزی رتیلولین a, b, c و d به ترتیب گروه های کنترل، bFGF، CAP و bFGF+CAP را نشان دادند (x100). بیشترین تولید رتیلولین در گروه bFGF+CAP است و به میزان کمتر در دیده می شود.

شناسی کیفیت پایین تری نسبت به بافت اولیه تاندون می شود. این روند ترمیمی طبیعی تاندون بسیار طولانی است و نتیجه آن بافت ترمیمی و نامناسبی با خواص بیومکانیک بسیار پایین تر از تاندون سالم است و این امر باعث کاهش قابلیت قدرتی و حرکتی اندام درگیر شده میشود و این مساله می تواند باعث پایان دوران فعالیت حرفه ای ورزشکاران و یا حیوانات مسابقه شود (۱۴, ۱۸). در مطالعه ی حاضر، که به منظور ارزیابی تاثیر پلاسما ی سرد اتمسفریک و فاکتور دو رشد فیبروبلاست بر استقامت تاندون آشیل آسیب دیده خرگوش انجام شد مشخص شد استفاده از پلاسما ی سرد اتمسفریک به همراه فاکتور رشد دو فیبروبلاست باعث بهبود روند ترمیمی در آشیل آسیب دیده خرگوش میشود که متعاقب آن باعث افزایش استقامت کششی تاندون میشود که این نتایج اختلاف معناداری را با گروه کنترل و گروه هایی که تنها از یکی از آنها استفاده شد را نشان می دهد. در حال حاضر درمان آسیب های تاندون به دو دسته درمان های جراحی و غیر جراحی تقسیم می شود. در بسیاری از موارد، روش درمانی عموماً غیر جراحی است و جراحی های ترمیمی در پارگی های کامل تاندون در نظر گرفته می شود (۱۰, ۲۷). محتوای کلاژن در مقایسه با تاندون های بدون آسیب کاهش یافته با پاره شدن تحت استرس کشش ارتباط دارد (۱۵). درمان هایی با کاربردهای بالینی مانند اولتراسوند، لیزر کم توان، پلاسما ی سرد، میدان مغناطیسی، تحریک الکتریکی، تزریق پلاسما ی غنی از پلاکت و حتی کاشت سلول های کشت شده در شرایط مختلف اثرات قابل توجهی از خود نشان داده است (۲۴). در سال های اخیر، فاکتورهای رشد یک درمان محبوب برای آسیب های تاندون بوده است که روش های درمانی جدیدی را در مورد بهبود آسیب های تاندون ارائه می کند (۱۶). به عنوان مثال، ترکیب bFGF، پروتئین مورفوژنتیک استخوان (BMP-12)، و فاکتور رشد تبدیل کننده بتا ۱ ( $TGF\beta 1$ ) در



نمودار ۲ نتایج آزمون کشش گروه ها که عملکرد بهتر گروه bFGF- CAP را نشان می دهد. \*  $P \leq 0.03$ , \*\*  $P \leq 0.002$ , ns= Not significant

#### بحث

داروهای ضد التهاب غیر استروئیدی به عنوان تسکین صدمات تاندون در انسان و حیواناتی که فعالیت جسمی بالایی دارند رایج است و درمان این عوارض می تواند بسیار چالش برانگیز باشد (۲۷). به دنبال آسیب، تاندون ها از نظر بیولوژیکی در سطح سلول و ماتریکس خارج سلولی دچار تغییراتی می شوند از جمله تجمع سلول های التهابی در محل ترمیم دیده با ترشح آنزیم ها باعث تحلیل ماده زمینه ای و همچنین تغییرات در ساختار و تراکم رشته های کلاژن می شوند فرایند رگ زایی از سویی باعث افزایش خونرسانی شده و از سمت دیگر موجب کاهش استقامت بافت در دراز مدت میشود (۶, ۱۱). علیرغم تغییر شکل شدید بافت ترمیم شده در ماه های بعد از آسیب، احیا کامل تاندون هرگز به دست نمی آید. بافت جایگزین در ناحیه آسیب دیده هیپرسلولار می ماند. قطر فیبریل های کلاژن نازک تر شده و در نتیجه کاهش قدرت بیومکانیکی تاندون رخ میدهد. در تاندون آشیل دچار تاندونوپاتی و یا پارگی، نسبت کلاژن نوع ۱ کاهش می یابد و میزان کلاژن نوع ۳ افزایش می یابد که منجر به کاهش قدرت کششی بافت جدید است. همچنین آسیب های کوچک و مکرر به تاندون باعث ایجاد بافت هیپرتروفیک و از لحاظ بافت



بوده نتایج بدست آمده نشانگر افزایش سنتز و بهبود آرایش کلاژن در گروه های درمانی نسبت به گروه کنترل بود. همچنین می توان حضور کم سلول های التهابی و کاهش توسعه عروقی در تاندون ها را به مدت طولانی پس از جراحی نسبت داد (۱۰). نسبت رتیکولین به فیبرهای کلاژن در بهبود تاندون بیشتر قابل توجه است. بیان بیشتر فیبر رتیکولین نشان دهنده قدرت تاندون بیشتر است. این فیبر با استفاده از رنگ رتیکولین شناسایی شد. مقاومت بالاتر گروه درمان در آزمون کشش را نیز میتوان با افزایش رشته های رتیکولین و آرایش و ساختار بهتر رشته های کلاژن مرتبط دانست (۲۳، ۲۸).

#### نتیجه گیری

پلاسمای سرد اتمسفریک و فاکتور دو رشد فیبروبلاست هر یک به تنهایی اثرات مثبت بر مراحل ترمیم تاندون آسیب دیده دارند و استفاده همزمان این درمان ها با کاهش التهاب و تحریک فعالیت های سلولی و افزایش سنتز کلاژن به تسریع پروسه ترمیم در نواحی التیام یافته کمک کرده و موجب افزایش استقامت تاندون در برابر کشش و بهبود عملکرد تاندون و در نهایت بازگشت عملکرد اندام می شوند. بنابراین استفاده همزمان این درمان ها کمک بیشتری به کاهش زمان ترمیم و بازگشت کارکرد اندام در بیماران می کند.

#### فهرست منابع

1. Amini M, Ghoranneviss M. Effects of cold plasma treatment on antioxidants activity, phenolic contents and shelf life of fresh and dried walnut (*Juglans regia* L.) cultivars during storage. *Lebensm Wiss Technol*. DOI: 2016;73:178-84. 10.1016/j.lwt.2016.06.014.
2. Amini M, Momeni M, Jahandideh A, Ghoranneviss M, Soudmand S, Yousefi P, et al. Tendon repair by plasma jet treatment.

یک مطالعه برای درمان آسیب های تاندون استفاده شد. در مطالعه ای اسفنج های کلاژن حاوی فاکتورهای رشد (bFGF)، BMP-12، و TGFβ1 را در تاندون های آشیل موش صحرایی کاشته شد. یافته ها نشان داد که بار تاندون بهبود یافته و استقامت تاندون در مقایسه با گروه کنترل بالاتر بود، علاوه بر این، دسته های کلاژن ضخیم تر و توسعه عروقی محدودی را دارا بود. (۱۹). بیان بیشتر (FGF) ها به معنی ترمیم بهتر در تاندون آسیب دیده، درد خفیف، انعطاف پذیری بیشتر و توانایی فیزیکی بیشتر است و (FGF-2) باعث افزایش قابل توجه استحکام مکانیکی در هفته های ۶ و ۱۲ بعد از آسیب تاندون در مقایسه با گروه کنترل را نشان داد است (۳۲). محققان دریافته اند که پلاسمای سرد اتمسفری (CAP) می تواند تکثیر فیبروبلاست را تحریک کند (۷، ۱۲). درمان با پلاسمای جت می تواند بیان سایتوکین های پیش التهابی، (PCNA) و (Ki67) (نشانگرهای تکثیر) را القا کند. همچنین سنتز ماتریکس متالوپروتئیناز و کلاژن نوع ۱ را بهبود می بخشد. با این حال، می تواند بیان Apaf1 و p53 (مارکرهای آپوپتوتیک) را کاهش دهد همچنین درمان با جت پلاسمای می تواند عمر و تکثیر سلولی را افزایش دهد و روند التهابی را بهبود بخشد (۱۷). تحقیقات نشان دادند که یک درمان دو دقیقه ای با CAP می تواند تولید سایتوکین ها، فاکتورهای رشد و تکثیر و مهاجرت فیبروبلاست در زخم را افزایش داده و باعث افزایش سنتز کلاژن شوند (۳). مطالعه حاضر بر پایه تحقیقات پیشین در مورد تسریع روند ترمیم تاندون و بهبود بافت با استفاده از فاکتور دو رشد فیبروبلاست دو و پلاسمای سرد اتمسفریک و صورت گرفته که نتایج بدست آمده اثر بخشی این روش های نوین در جراحات تاندونی را مورد تایید قرار می دهد. (۲، ۸، ۲۲، ۲۹). هدف ما در این مطالعه بررسی تاثیر درمان توام پلاسمای سرد اتمسفری و فاکتور دو رشد فیبروبلاست در آسیب تاندونی



- J Diabetes Metab Disord. 2021;20(1):621-6. DOI: 10.1007/s40200-021-00789-0.
3. Arndt S, Unger P, Berneburg M, Bosserhoff A-K, Karrer S. Cold atmospheric plasma (CAP) activates angiogenesis-related molecules in skin keratinocytes, fibroblasts and endothelial cells and improves wound angiogenesis in an autocrine and paracrine mode. *Journal of dermatological science*. 2018;89(2):181-90. DOI: 10.1016/j.jdermsci.2017.11.008.
  4. Arndt S, Unger P, Wacker E, Shimizu T, Heinlin J, Li YF, et al. Cold atmospheric plasma (CAP) changes gene expression of key molecules of the wound healing machinery and improves wound healing in vitro and in vivo. *PloS one*. 2013;8(11):e79325. DOI: 10.1371/journal.pone.0079325.
  5. Cai T-Y, Zhu W, Chen X-S, Zhou S-Y, Jia L-S, Sun Y-Q. Fibroblast growth factor 2 induces mesenchymal stem cells to differentiate into tenocytes through the MAPK pathway. *Molecular medicine reports*. DOI: 10.3892/mmr.2013.1668.
  6. Chamberlain CS, Duenwald-Kuehl SE, Okotie G, Brounts SH, Baer GS, Vanderby R. Temporal healing in rat achilles tendon: ultrasound correlations. *Ann Biomed Eng*. 2013;41(3):477-87. DOI: 10.1007/s10439-012-0689-y.
  7. Chatraie M, Torkaman G, Khani M, Salehi H, Shokri B. In vivo study of non-invasive effects of non-thermal plasma in pressure ulcer treatment. *Sci Rep*. 2018;8(1):5621. DOI: 10.1038/s41598-018-24049-z.
  8. Chen J, Svensson J, Sundberg CJ, Ahmed AS, Ackermann PW. FGF gene expression in injured tendons as a prognostic biomarker of 1-year patient outcome after Achilles tendon repair. *J Exp Orthop*. 2021;8(1):20. DOI: 10.1186/s40634-021-00335-0.
  9. Cheng KY, Lin ZH, Cheng YP, Chiu HY, Yeh NL, Wu TK, Wu JS. Wound Healing in Streptozotocin-Induced Diabetic Rats Using Atmospheric-Pressure Argon Plasma Jet. *Sci Rep*. 2018;8(1):12214. DOI: 10.1038/s41598-018-30597-1.
  10. Docheva D, Muller SA, Majewski M, Evans CH. Biologics for tendon repair. *Adv Drug Deliv Rev*. 2015;84:222-39. DOI: 10.1016/j.addr.2014.11.015.
  11. Ehrlich HP, Lambert PA, Siggers GC, Myers RL, Hauck RM. Dynamic changes appearing in collagen fibers during intrinsic tendon repair. *Ann Plast Surg*. 2005;54(2):201-6. DOI: 10.1097/01.sap.0000141380.52782.db.
  12. Eisenhauer P, Chernets N, Song Y, Dobrynin D, Pleshko N, Steinbeck MJ, Freeman TA. Chemical modification of extracellular matrix by cold atmospheric plasma-generated reactive species affects chondrogenesis and bone formation. *J Tissue Eng Regen Med*. 2016;10(9):772-82. DOI: 10.1002/term.2224.
  13. Galatz LM, Gerstenfeld L, Heber-Katz E, Rodeo SA. Tendon regeneration and scar formation: The concept of scarless healing. *J Orthop Res*. 2015;33(6):823-31. DOI: 10.1002/jor.22853.
  14. Guerra Fda R, Vieira CP, dos Santos de Almeida M, Oliveira LP, Claro AC, Simoes GF, et al. Pulsed LLLT improves tendon healing in rats: a biochemical, organizational, and functional evaluation. *Lasers Med Sci*. 2014;29(2):805-11. DOI: 10.1007/s10103-013-1406-2.
  15. Hansen P, Kovanen V, Holmich P, Krogsgaard M, Hansson P, Dahl M, et al. Micromechanical properties and collagen composition of ruptured human achilles tendon. *Am J Sports Med*. 2013;41(2):437-43. DOI: 10.1177/0363546512470617.
  16. Kataoka T, Mifune Y, Inui A, Nishimoto H, Kurosawa T, Yamaura K, et al. Combined therapy of platelet-rich plasma and basic fibroblast growth factor using gelatin-hydrogel sheet for rotator cuff healing in rat models. *J Orthop Surg Res*. 2021;16(1):605. DOI: 10.1186/s13018-021-02771-1.
  17. Kleineidam B, Nokhbehshaim M, Deschner J, Wahl G. Effect of cold plasma on

- periodontal wound healing-an in vitro study. *Clin Oral Investig.* 2019;23(4):1941-50. DOI: 10.1007/s00784-018-2643-3.
18. Kwon J, Kim SH, Lee YH, Kim TI, Oh JH. The Rotator Cuff Healing Index: A New Scoring System to Predict Rotator Cuff Healing After Surgical Repair. *Am J Sports Med.* 2019;47(1):173-80. DOI: 10.1177/0363546518810763.
  19. Majewski M, Heisterbach P, Jaquiere C, Durselen L, Todorov A, Martin I, et al. Improved tendon healing using bFGF, BMP-12 and TGFbeta1 in a rat model. *Eur Cell Mater.* 2018;35:318-34. DOI: 10.22203/eCM.v035a22.
  20. Meheux CJ, McCulloch PC, Lintner DM, Varner KE, Harris JD. Efficacy of Intra-articular Platelet-Rich Plasma Injections in Knee Osteoarthritis: A Systematic Review. *ARTHROSCOPY.* 2016;32(3):495-505. DOI: 10.1016/j.arthro.2015.08.005.
  21. Moosmayer S, Lund G, Seljom US, Haldorsen B, Svege IC, Hennig T, et al. At a 10-Year Follow-up, Tendon Repair Is Superior to Physiotherapy in the Treatment of Small and Medium-Sized Rotator Cuff Tears. *J Bone Joint Surg Am.* 2019;91(12):60-1050. Doi:10.2106/JBJS.18.01373.
  22. Najafbeygi A, Fatemi MJ, Lebaschi AH, Mousavi SJ, Hussein SA, Niazi M. Effect of basic fibroblast growth factor on Achilles tendon healing in rabbit. *World Journal of Plastic Surgery.* 2017;6(1):26.
  23. Parmar K. Tendon and ligament: basic science, injury and repair. *Orthop Trauma.* 2018;32(4):241-4. Doi: 10.1016/j.mporth.2018.05.008.
  24. Roche AJ, Calder JD. Achilles tendinopathy: A review of the current concepts of treatment. *Bone Joint J.* 2013;95-B(10):1299-307. DOI: 10.1302/0301-620X.95B10.31881
  25. Rosenbaum AJ, Wicker JF, Dines JS, Bonasser L, Razzano P, Dines DM, Grande DA. Histologic stages of healing correlate with restoration of tensile strength in a model of experimental tendon repair. *HSS J.* 2010;6 DOI: 10.1007/s11420-009-9152-5.
  26. Seiwerth S, Rucman R, Turkovic B, Sever M, Klicek R, Radic B, et al. BPC 157 and Standard Angiogenic Growth Factors. Gastrointestinal Tract Healing, Lessons from Tendon, Ligament, Muscle and Bone Healing. *Curr Pharm Des.* 2018;24(18):1972-89. DOI: 10.2174/1381612824666180712110447.
  27. Sharma P, Maffulli N. Tendon injury and tendinopathy: healing and repair. *J Bone Joint Surg Am.* 2005;87(1):187-202. DOI: 10.2106/JBJS.D.01850.
  28. Soteropoulos DS, Williams ER, Baker SN. Cells in the monkey ponto-medullary reticular formation modulate their activity with slow finger movements. *Physiol J.* 2012;590(16):4011-27. DOI: 10.1113/jphysiol.2011.225169.
  29. Steinbeck MJ, Chernets N, Zhang J, Kurpad DS, Fridman G, Fridman A, Freeman TA. Skeletal cell differentiation is enhanced by atmospheric dielectric barrier discharge plasma treatment. *PloS one.* 2013;8(12):e82143. DOI: 10.1371/journal.pone.0082143.
  30. Thomopoulos S, Parks WC, Rifkin DB, Derwin KA. Mechanisms of tendon injury and repair. *J Orthop Res.* 2015;33(6):832-9. DOI: 10.1002/jor.22806.
  31. Yang SM, Chen WS. Conservative Treatment of Tendon Injuries. *Am J Phys Med Rehabil.* 2020;99(6):550-7. DOI: 10.1097/PHM.0000000000001345.
  32. Yonemitsu R, Tokunaga T, Shukunami C, Ideo K, Arimura H, Karasugi T, et al. Fibroblast Growth Factor 2 Enhances Tendon-to-Bone Healing in a Rat Rotator Cuff Repair of Chronic Tears. *AJSM.* 2019;47(7):1701-12. DOI: 10.1177/03635465198